



小鼠肺纤维化模型中衰老对肺干细胞的影响

何立锋¹ 龚松迪¹ 宋 舸² 李晓燕¹ 沈晓强¹ 林倩雅¹ 傅晓岚¹ ,
姚 超¹ 鞠振宇¹ 张玲玲¹

(1. 杭州师范大学 杭州 311121; 2. 首都医科大学怀柔教学医院骨外科 北京 101400)

【摘要】 目的 研究衰老对肺干细胞在博来霉素致肺纤维化小鼠模型中修复能力的影响。方法 利用博来霉素处理年轻、年老小鼠建立肺纤维化模型,通过流式细胞术等方法比较肺组织干细胞在年轻、年老小鼠肺纤维化模型中的比例及增殖情况,研究衰老对肺组织干细胞的损伤修复能力的影响。结果 在博来霉素致肺纤维化的模型中,年老小鼠相对年轻小鼠肺组织干细胞增殖明显降低,肺上皮干细胞和肺间质干细胞比例显著下降。结论 在衰老过程中肺组织干细胞在肺纤维化损伤后修复能力明显减弱。

【关键词】 肺干细胞; 衰老; 流式细胞术; 肺纤维化; 小鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013) 07-0007-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.007.002

Impact of aging on repair capability of lung stem cells in a mouse model of pulmonary fibrosis

HE Li-feng¹, GONG Song-di¹, SONG Ge², LI Xiao-yan¹, SHEN Xiao-qiang¹, LIN Qian-ya¹, FU Xiao-lan¹,
YAO Chao¹, JU Zhen-yu¹, ZHANG Ling-ling¹

(1. Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China; 2. Beijing Huairou Teaching Hospital, Capital Medical University, Beijing 101400)

【Abstract】 Objective To study the impact of aging on the capability of regeneration and differentiation of lung stem cells in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Methods** The proportion of lung stem cells in mice after bleomycin treatment was analyzed by flow cytometry. The repair capability of lung stem cells in young and old mice was examined by immunohistochemistry and flow cytometry. **Results** The ratio of lung epithelial stem cells/lung total cells and lung mesenchymal stem cells/lung total cells were significantly decreased in the aged mice. The proliferating lung stem cells/lung total cells reduced in old mice during the repair process of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Conclusion** The repair capability of lung stem cells during bleomycin-induced pulmonary fibrosis is decreased in aging.

【Key words】 Lung stem cells; Aging; Flow cytometry; Pulmonary fibrosis; Mouse

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是以肺泡壁(包括呼吸性细支气管)发生弥漫性慢性炎症和间质纤维化为特征的疾病。该疾病发病机制尚不明

了,尚无有效的治疗手段。衰老(aging)是肺纤维化发病的独立危险因素。研究表明,肺干细胞(lung stem cell, LSC)在肺组织损伤修复和稳态维持中发

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81070047);2012年度浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)。

[作者简介]何立锋(1993-),男,本科生。

[通讯作者]张玲玲(1982-),女,助教,博士。研究方向:衰老与成体干细胞。E-mail: zhangll821025@163.com。

挥重要作用。在衰老过程中,肺组织的形态结构发生改变,通气功能逐渐减弱,在损伤的状态下可能存在着肺干细胞增殖分化和稳态维持的失衡。博来霉素能够特异性损伤肺泡上皮细胞,为常用制作肺纤维化模型药物^[1]。最新报道利用流式细胞分析技术(flow cytometry analysis)对肺组织干细胞进行分析和分选,极大地方便了对肺组织损伤修复过程的研究^[2-4]。因此,本实验中利用流式细胞技术比较年轻、年老肺纤维化小鼠模型肺组织干细胞的比例和增殖情况,了解衰老对肺组织干细胞在肺纤维化损伤修复中的影响。

1 材料和方法

1.1 肺干细胞流式分析

根据文献报道^[2-5],在肺组织悬液中用流式细胞术排除内皮细胞(CD31⁻)、排除白细胞(CD45⁻)、排除红细胞(Ter119⁻)、排除死细胞(DAPI⁻)后的细胞为肺组织细胞的总体,分析 Sca-1⁺CD34⁺标记远端肺干细胞,Sca-1⁺EpCAM⁻标记肺间质干细胞;Sca-1⁺EpCAM⁺标记肺上皮干细胞。CD31-biotin,CD45-biotin,SA-PE/FITC,Sca-1-PE-Cy7 抗体用稀释液 10 倍稀释;肺组织细胞悬液离心后去上清,保留终体积约 50 μ L。加入 CD31-biotin(1:10)10 μ L,CD45-biotin(1:10)10 μ L,冰上孵育 30 min;加入 PBS 2 mL,1500 r/m 离心 5min,去上清。加入 SA-PE(1:10)15 μ L,Sca-1-PE-Cy7(1:10),APC-epicam(1:10)稀释液 10 μ L,CD34-FITC 3 μ L 冰上孵育 45 min;加入 PBS 2 mL,用 50 μ m 滤膜过滤,1500 r/m 离心 5 min;去上清,加入 PBS 300 μ L 混匀,利用流式细胞仪分析肺上皮干细胞的比例。同时用 BrdU 和 Thy-1 分别标记增殖细胞和间质干细胞,流式细胞术分析增殖细胞和 Thy-1⁺及 Thy-1⁻间质干细胞的比例。

1.2 博来霉素肺损伤模型的制备

C57 BL/6J 野生型小鼠分为老龄组和低龄组,低龄组 8 周大小,老龄组 104 周大小,每组 4 只。老龄组和低龄组 C57 BL/6J 小鼠 150 mg/kg 博来霉素气管内给药^[6]。老龄、低龄对照组每组 4 只。14 d 后取小鼠肺组织实验。SPF 级 C57BL/6J 小鼠,来源于杭州师范大学实验动物中心【SCXK(浙)2011-0048】。肺纤维化模型构建在杭州师范大学医学实验中心进行【SYXK(浙)20110157】。

1.3 苏木素-伊红染色

将小鼠脱颈处死,分离肺组织取右下肺叶,固

定于 4% 多聚甲醛溶液中,24 h 后石蜡包埋。进行连续石蜡切片,厚度 5 μ m。切片固定到载玻片上。切片脱水后,进行苏木素伊红染色。

1.4 免疫荧光染色

将小鼠脱颈处死,分离肺组织取右下肺叶,固定于 4% 多聚甲醛溶液中,24 h 后石蜡包埋。进行连续石蜡切片,厚度 5 μ m。切片固定到载玻片上。对石蜡切片进行胞内抗原 SPC 染色,观察肺损伤修复过程中肺泡 I 型和 II 型上皮细胞的形态结构^[7]。

1.5 统计学分析

数据结果均用均数 \pm 标准差表示,组间比较采用 Student *t* 检验。

2 结果

2.1 衰老对肺间质干细胞的组成影响

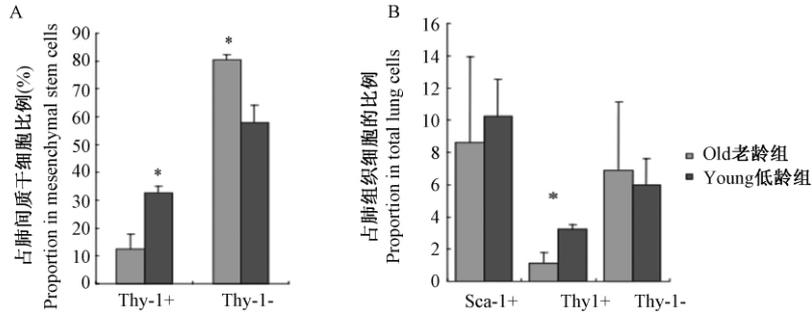
为研究衰老对小鼠肺中不同间质干细胞的比例的影响,我们分析了年轻和年老的 C57BL/6J 野生型小鼠的肺中间质干细胞的 Thy-1 的表达(图 1)。结果显示与低龄组小鼠相比,老龄组小鼠的肺间质干细胞占肺组织细胞的比例没有变化,但是 Thy-1⁻肺间质干细胞占总肺间质干细胞比例显著升高,Thy-1⁺肺间质干细胞占总肺间质细胞及肺组织细胞比例显著降低。

2.2 衰老对肺纤维化模型小鼠的肺组织病理改变的影响

博来霉素处理小鼠肺泡上皮细胞损伤广泛,并出现坏死,细胞数目开始减少;肺泡闭合和代偿性扩张同时存在,炎性细胞由中性粒细胞为主转变为以巨噬细胞为主。肺间质炎症加重,渗出增多,可见巨噬细胞和淋巴细胞浸润;成纤维细胞开始增生,胶原合成增加;毛细血管广泛狭窄和(或)闭塞,血管微血栓形成较多(图 2 A、C,彩插 1)。其中老龄模型组较低龄模型组小鼠肺泡上皮细胞破坏严重,数量明显减少;肺泡间隔增厚显著,肺泡闭合及塌陷明显,肺间质炎症渗出严重(图 2 A、C,彩插 1)。

2.3 衰老对肺纤维化模型小鼠中 II 型肺泡上皮的影响

将各小鼠的肺组织取出经固定,包埋等制成石蜡切片,进行免疫荧光染色(标记 pro-SPC)(图 3 A、B、C、D,彩插 1)。免疫荧光 pro-SPC 特异性染色可见模型组较对照组小鼠的 II 型肺泡上皮细胞数量明显减少。老龄对照组较低龄对照组肺泡数量减

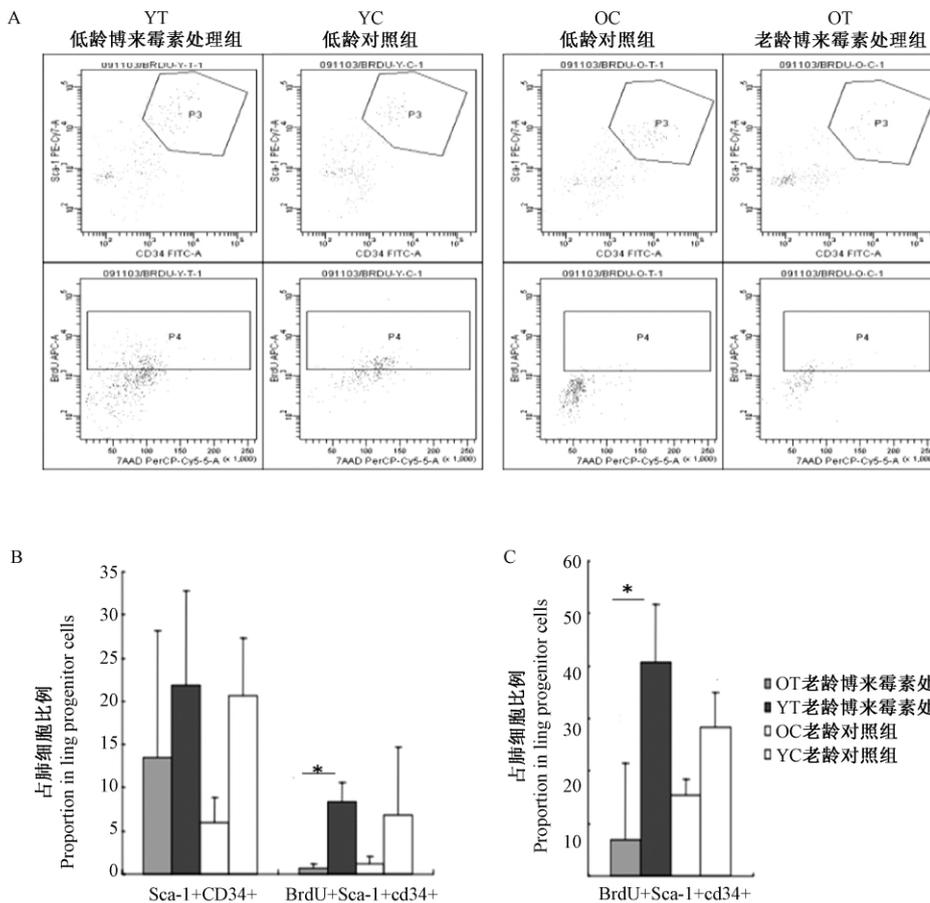


注: (A) Thy-1⁺ 及 Thy-1⁻ 肺间质干细胞占肺间质干细胞的比例; (B) 肺间质干细胞, Thy-1⁺ 及 Thy-1⁻ 肺间质干细胞细胞占肺组织细胞比例。OLD 为老龄组 (n=4), YOUNG 为低龄组 (n=4) * P<0.05。

图 1 年轻和年老小鼠肺间质干细胞比例的比较

Note: (A) Comparison of the proportion of Thy-1⁺ and Thy-1⁻ mesenchymal stem cells in lung mesenchymal stem cells. (B) Comparison of the proportion of mesenchymal stem cells, Thy-1⁺ and Thy-1⁻ mesenchymal stem cells in lung progenitor cells

Fig. 1 Comparison of Thy-1⁺ and Thy-1⁻ mesenchymal stem cells in the old and young groups



注: (A) 博来霉素处理后各组小鼠的肺干细胞及增殖细胞流式分析图; (B) 肺干细胞及增殖细胞 (BrdU⁺ 肺干细胞) 占肺组织细胞比例; (C) 肺干细胞中 BrdU 标记的增殖细胞所占比例。OT 为老龄博来霉素处理组 (n=3), YT 为低龄博来霉素处理组 (n=3), OC 为老龄对照组 (n=3), YC 为低龄对照组 (n=3) * P<0.05。

图 4 衰老对肺干细胞及肺损伤及修复能力的影响

Note: (A) The flow cytometric analysis after bleomycin-induced pulmonary fibrosis. (B) The proportion of lung stem cells and proliferating cells in lung cells. (C) The proportion of proliferating cells in lung stem cells.

Fig. 4 Comparison of the lung stem cells and proliferating cells in the young and old groups after bleomycin-induced pulmonary fibrosis

少, II 型肺泡上皮细胞减少(图 3A、B, 彩插 1)。老龄模型组较低龄模型组残余的 II 型肺泡上皮细胞减少(图 3B、D, 彩插 1)。

2.4 衰老对肺纤维化模型小鼠肺干细胞的数量和增殖能力的影响

低龄和老龄对照组小鼠肺干细胞占肺组织细胞比例亦无明显差异, 增殖的肺干细胞比例亦无明显差异(图 4B、C, 彩插 1)。在博来霉素处理的肺纤维化模型中, 肺干细胞占肺组织细胞比例老龄组较低龄组有降低趋势, 肺干细胞中增殖细胞比例老龄组明显低于低龄组(图 4B、C, 彩插 1)。

3 讨论

肺纤维化发生的假说之一是肺组织上皮细胞的衰老, 以及肺间质细胞的过度增生。有关肺衰老相关疾病的致病机制仍有待深入了解。我们对成体肺干细胞的自我更新和分化能力在衰老及博来霉素致肺纤维化模型中的变化进行了研究, 以期在成体干细胞水平对肺部的衰老和衰老相关疾病的发生机制进行探讨。

肌成纤维细胞与肺纤维化的发生密切相关。人的肌成纤维细胞不表达 Thy-1 抗原^[8], 而研究发现在肺纤维化形成过程中 Thy-1⁻ 成纤维细胞增加^[9], 通过对年轻和老年组的肺组织干细胞流式分析我们发现年老小鼠肺 Thy-1⁻ 细胞比例较年轻鼠增加, Thy-1⁺ 比例下降, 这些数据表明衰老对小鼠的远端肺间质干/前体细胞中 Thy-1⁺ 和 Thy-1⁻ 细胞群影响显著, 提示在衰老过程中导致肺间质干细胞的组成发生了变化, 向肌成纤维细胞分化的比例升高。但是在正常生理状态下肺组织干细胞的增殖和分化并不活跃。正常生理状态下的年老小鼠并未出现肺组织形态的异常。为进一步检测衰老在肺纤维化发生中的作用, 我们建立了博来霉素诱导的特异性肺上皮细胞损伤小鼠动物模型, 该模型为最常用的肺纤维化模型。我们发现年老小鼠较年轻小鼠在建模后肺纤维化表现更为明显, 具体表现为肺上皮细胞损伤更严重, 小鼠肺泡 II 型上皮细胞较年轻小鼠减少更加明显。以上数据表明衰老加

重了肺纤维化发生的病变。为了进一步检测衰老是否通过影响肺组织干细胞在博来霉素肺损伤过程中数量及修复能力影响了病变程度, 我们用流式对肺组织干细胞标记并进行分析。分析结果表明博来霉素处理产生的肺纤维化过程中年老组小鼠的肺上皮干细胞比例及增殖细胞数目明显低于低龄组。上述数据表明在衰老过程中肺上皮干细胞的比降低, 增殖能力下降, 肺损伤修复的能力存在明显的减弱趋势, 这可能为衰老更易产生肺组织损伤及病变更严重的原因。

(本文图 2, 图 3 见彩插 1。)

参考文献:

- [1] Mouratis MA, Aidinis V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2011, 17(5): 355-361.
- [2] Bertonecello McQualter IJ. Isolation and clonal assay of adult lung epithelial stem/progenitor cells [M]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, Chapter 2 (2011) Unit 2G.1.
- [3] Ding BS, Nolan DJ, Guo P, et al. Endothelial-derived angiocrine signals induce and sustain regenerative lung alveolarization [J]. *Cell*, 2011, 147: 539-553.
- [4] Kajstura Rota JM, Hall SR, et al. Evidence for human lung stem cells [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364: 1795-1806.
- [5] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer [J]. *Cell*, 2005, 121: 823-835.
- [6] Tsai KD, Yang SM, Lee JC, et al. Panax notoginseng attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011, 1-7. Article ID 404761
- [7] Rock JR, Barkauskas CE, Currence MJ, et al. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: E1475-1483.
- [8] Koumas L, Smith TJ, Feldon S, et al. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163: 1291-1300.
- [9] Hagood JS, Prabhakaran P, Kumbha P, et al. Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2005, 167: 365-379.

(修回日期) 2012-11-15